

ارزیابی اثرات محافظتی کروسین بر روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در موش‌های سوری درمان شده با سیکلوفسفامید

فهیمة خان محمدی قانع*، رسول شهروز، عباس احمدی، مزدک رازی

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: سیکلوفسفامید در کنار نقش درمانی دارای اثرات سرکوب سیستم ایمنی، القای استرس اکسیداتیو، تأثیر بر DNA سلول‌های جنسی و کاهش قدرت باروری است. هدف این مطالعه ارزیابی اثرات محافظتی کروسین بر روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در موش‌های سوری درمان شده با سیکلوفسفامید بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۳۶ سرموش سوری ماده ۸-۶ هفته‌ای به ۳ گروه مساوی تقسیم شده و به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. به گروه کنترل روزانه سرم فیزیولوژی (۱/۰ میلی‌لیتر به صورت درون صفاقی)، به گروه کنترل شم سیکلوفسفامید یک بار در هفته (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم درون صفاقی) و به گروه تجربی سیکلوفسفامید به همان روش به همراه تزریق روزانه کروسین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم درون صفاقی) تجویز شد. پس از پایان دوره درمان، تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از PMSG و HCG انجام شد. از ۶ سر موش سوری نر بالغ بارور جهت تهیه اسپرم نرمال استفاده شد. حیوانات پس از بیهوشی آسان‌کشی شدند و پس از استحصال تخمک و اسپرم‌های نرمال و انجام لقاح در محیط کشت HTF+4mg BSA، تخمک‌های لقاح یافته به مدت ۱۲۰ ساعت انکوبه شدند و مراحل رشد جنینی در این مدت مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با آزمون آماری روش مقایسه نسبت‌ها تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در گروه کنترل شم کاهش معنی‌داری در تعداد اووسیت‌های مناسب، درصد لقاح، دوسلولی، بلاستوسیست و افزایش معنی‌داری در تعداد جنین‌های متوقف شده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد و تجویز کروسین باعث افزایش معنی‌دار تعداد اووسیت‌های مناسب، درصد لقاح، دوسلولی، بلاستوسیست‌ها و کاهش معنی‌دار تعداد جنین‌های متوقف شده نسبت به گروه کنترل شم گردید ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: تجویز کروسین به همراه شیمی‌درمانی با سیکلوفسفامید باعث بهبود روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی شد.

واژه‌های کلیدی: کروسین، سیکلوفسفامید، موش سوری، تخمک، لقاح داخل آزمایشگاهی

*نویسنده مسئول: فهیمة خان محمدی قانع، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

Email: Fahimekh685@yahoo.com

مقدمه

تماس با مواد آگروژن اعم از مواد طبیعی یا ساخته دست بشر، تأثیر عمیقی بر فرآیندهای حیاتی گذاشته و موجب کاهش توان تولید مثلی و یا از بین رفتن آن می‌شوند (۱). در حیوان ماده در صورتی که در تماس با مواد شیمیایی قرار گیرد، بر سلول اووسیت که در مراحل مختلف مقدماتی، اولیه، ثانویه و یا در مرحله تخمک گذاری است، تأثیر می‌گذارد. بیشتر مواد شیمی‌درمانی موتاژن بوده و باعث ایجاد نقص در کروموزوم‌های سلول‌های جنسی می‌شوند. مواد آلکیله کننده از جمله سیکلوفسفامید، باعث موتاسیون ژنی، شکست کروموزومی و آنوپلوئیدی در سلول‌های سوماتیک می‌شود (۲). هم‌چنین سیکلوفسفامید موجب نابودی فولیکول‌های مقدماتی شده و به علت کاهش ذخیره فولیکولی، تأثیر منفی روی سیستم تولید مثلی داشته و موجب ناباروری و یائسگی زودرس در جنس ماده می‌شود (۳). در تحقیقی که بر روی خوک انجام گرفته دیده شده است که ۴۸ ساعت پس از تزریق سیکلوفسفامید در محیط کشت بر روی اووسیت، بلوغ میوز مهار می‌شود (۴). سیکلوفسفامید بر روی کروماتین اثر گذاشته و بخشی از اثرات آن در نسل بعدی F2 مشاهده شده است (۵). تزریق سیکلوفسفامید به موش‌های آزمایشگاهی آبستن در روز سیزدهم جنینی، موجب ایجاد نقص در فرآیند سینیپتونمال به صورت سینیپس جزئی و یا عدم سینیپس دو طرفه در روز هفدهم جنینی خواهد شد (۶). استرس اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد

اکسیژن در مقابل ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانتی سلول ایجاد می‌شود که منجر به تولید انواع رادیکال‌های آزاد شامل آنیون سوپراکسید (O₂⁻), رادیکال هیدروکسیل (OH) و مشتقات غیر رادیکالی از اکسیژن مانند هیدروژن پراکسید (H₂O₂) می‌شود. این رادیکال‌های آزاد به شدت ناپایدار بوده و به طور سریع و غیر اختصاصی با مولکول‌های زیستی واکنش نشان داده و منجر به ایجاد و گسترش انواع آسیب‌های سلولی از جمله پراکسیداسیون غشاء پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای امینه و نوکلئوتیک، آپوپتوز و نکروز می‌شود که در نهایت منجر به کاهش قدرت زیست پذیری و تکوین جنین‌ها در محیط کشت می‌گردد (۷-۹).

اختلالات تولید مثلی در هر دو جنس نروماده که به وسیله استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شوند، گزارش شده اند و تأثیر سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) روی زیگوت‌ها و یا در رشد ابتدایی جنین مشخص شده است. استرس اکسیداتیو می‌تواند مسئول توکسیسیتی جنینی در هیدروسالپینکس باشد (۱۰). افزودن آنتی‌اکسیدانت‌هایی نظیر ویتامین C و E به محیط کشت، نسبت تکوین بلاستوسیست در جنین‌های موش را بهبود می‌بخشد (۱۱) و موجب بهبود نسبت باروری و افزایش لانه‌گزینی می‌شود (۱۲). سیکلوفسفامید به عنوان دارویی مهم و مؤثر در درمان سرطان‌ها، علی‌رغم ایجاد بهبود در بیماران سرطانی، در بدن به عنوان یک عامل تولید کننده استرس اکسیداتیو عمل کرده و سطح تولید ROS را افزایش می‌دهد. لذا جهت تعدیل یا جلوگیری از

اثرات استرس اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله سیکلوفسفامید آیا عاملی نظیر کروسین که دارای نقش آنتی‌اکسیدانته می‌باشد، می‌تواند مفید واقع شود؟ مواد اصلی مؤثر در زعفران کرسنتین، کروسین و سافرانال می‌باشند که دارای اثرات از بین برنده رادیکال‌های آزاد هستند (۱۳) و برای درمان بیماری‌هایی که همراه با دژنره شدن عصبی و از دست رفتن حافظه است می‌توانند استفاده شوند (۱۴). عصاره زعفران دارای اثرات ضد توموری، کاهش دهنده چربی خون، ضد درد، ضد التهاب، ضد تشنج و ضد افسردگی در حیوانات و انسان، ضد سرفه و خلط‌آور است (۲۳-۱۵).

از آنجا که تا به حال مطالعه‌ای در زمینه تأثیر کروسین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت در کاهش اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید بر روی رشد جنین‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی صورت نگرفته است، در این مطالعه، اثر محافظتی کروسین بر بهبود روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی در موش‌های تحت درمان با سیکلوفسفامید مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، از ۳۶ سر موش سوری نژاد NMRI ماده بارور ۸-۶ هفته‌ای که به طور تصادفی به ۳ گروه مساوی تقسیم شده و به مدت ۲۱ روز تیمار شدند، استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد با دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰-۳۰ درصد و با سیکل نوری، ۱۴ ساعت روشنایی

و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب و غذا به صورت آزاد در دسترس بود. به گروه اول به عنوان کنترل، روزانه سرم فیزیولوژی (۰/۱ میلی لیتر، درون صفاقی)، به گروه دوم به عنوان کنترل شم، سیکلوفسفامید جهت ایجاد استرس اکسیداتیو یک بار در هفته (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، درون صفاقی) به مدت ۳ هفته و به گروه سوم یا گروه تجربی، سیکلوفسفامید به روش گروه کنترل شم به همراه تزریق روزانه کروسین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، درون صفاقی) صورت گرفت.

برای انجام این مطالعه به تحریک تخمک‌گذاری نیاز بود که بدین منظور پس از پایان دوره درمان و ۷۲ ساعت قبل از لقاح آزمایشگاهی (IVF) تزریق ۷/۵ واحد هورمون PMSG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر و ۴۸ ساعت بعد، تزریق ۷/۵ واحد هورمون HCG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی لیتر به روش داخل صفاقی انجام شد. عمل تخمک‌گذاری ۱۳ ساعت بعد از تزریق HCG انجام شد. مرحله اول از کار برای انجام IVF، تهیه اسپرم‌های نرمال از ۶ قطعه موش سوری نر بالغ بارور بود که به روش بیهوشی با تزریق کتامین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، درون صفاقی)، آسان‌کشی شدند. سپس پوست ناحیه شکمی با اتانول ۷۰ درصد استریل شده و پس از ایجاد برش در ناحیه شکم و جدا کردن بافت‌های هم‌بندی، اطراف دم اپیدیدیم همراه با مقداری از کانال دفران از بیضه جدا و به داخل پتری دیش ۲ سانتی‌متری حاوی محیط کشت HTF، دارای ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم BSA (سیگما،

محیط کشت HTF به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند و برای بررسی تأثیر تنش اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید و اثر آنتی‌اکسیدانتی کروسین، در زیر میکروسکوپ فازکنتراست، مراحل رشد جنینی در این مدت مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی میزان شکافتگی، ۲۴ ساعت بعد از کشت صورت گرفت و در زیگوت‌های موجود در هر گروه، جنین‌ها از نظر میزان فراگمانتاسیون، طی کردن مراحل رشد جنینی و تعداد جنین‌های متوقف شده با هم مقایسه شدند. تیپ‌بندی جنین‌های متوقف شده با توجه به فاکتورهای مختلفی نظیر لیز شدن جنین‌ها، نکروتیک بودن آنها، فراگمانتاسیون و وجود وزیکول‌های سیتوپلاسمیک صورت گرفت و به این ترتیب، تیپ I جنین‌های با لیز، فراگمانته شدن و نکروتیک بودن کامل، تیپ II جنین‌های با لیز و فراگمانته شدن در تعدادی از بلاستومرها و تیپ III جنین‌های با تعداد کمی بلاستومرهای لیز و فراگمانته و وزیکول سیتوپلاسمیک بود (۲۴). کیفیت جنین‌ها، تعداد جنین‌های رشد کرده، درصد شکافتگی با بررسی درصد جنین‌های دو سلولی، میزان جنین‌های متوقف شده و درصد بلاستوسیت‌های ایجاد شده در طی ۱۲۰ ساعت انکوباسیون در هر گروه، مورد ارزیابی قرار گرفت.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار Minitab و آزمون آماری روش مقایسه نسبت‌ها تجزیه و تحلیل شدند.

آمریکا)، که قبلاً جهت تعادل در داخل انکوباتور قرار داده شده بود منتقل شد و بعد از ایجاد چند برش در دم اپیدیدیم و فشار در کانال دفران برای خروج اسپرم‌ها، پتری دیش‌ها در داخل انکوباتور دی‌اکسید کربن گذاشته شدند. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه اسپرم‌ها خارج و در محیط پخش شدند. سپس اسپرم‌ها شستشو داده شد و با استفاده از روش شناورسازی، اسپرم‌های متحرک جدا و جهت ظرفیت‌یابی، به مدت یک ساعت در انکوباتور دی‌اکسید کربن با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۲۴).

در این مطالعه از نمونه‌های اسپرم نرمال با تحرک بالای ۸۰ درصد و به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت استفاده شد. مرحله دوم از کار، تخم‌گیری از موش‌های ماده بود که بدین منظور، ۱۳ ساعت پس از تزریق HCG (صبح روز بعد) با آسان‌کشی حیوانات بعد از بیهوشی با تزریق کتامین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، درون صفاقی)، لوله‌های رحمی جدا شد و در داخل محیط کشت HTF+4mg/ml BSA با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که از قبل آماده شده بود قرار داده شد و با استفاده از روش Dissecting تخمک‌ها خارج شده و پس از شستشو، به محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF (حاوی ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA) منتقل شدند و سپس اسپرم‌ها به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، به محیط کشت منتقل شد. عمل لقاح حدود ۵-۳ ساعت بعد از اضافه کردن اسپرم صورت گرفت و بدین ترتیب زیگوت‌ها به دست آمدند (۲۴). زیگوت‌های حاصله از همه گروه‌ها، در

یافته‌ها

با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش نشان داد ($p < 0.05$)، در حالی که تجویز کروسین در گروه تجربی سبب کاهش معنی‌دار درصد جنین‌های متوقف شده در مقایسه با گروه کنترل شم گردید ($p < 0.05$). در گروه کنترل شم، تعداد جنین‌های متوقف شده در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت و اکثر جنین‌های متوقف شده از تیپ I و II با درصد بالایی از لیز و فراگمانتاسیون بودند، در حالی که تجویز کروسین در گروه تجربی سبب کاهش معنی‌دار تعداد جنین‌های متوقف شده در مقایسه با گروه کنترل شم گردید و جنین‌های متوقف شده دارای کیفیت بهتر و اکثراً از تیپ III بودند ($p < 0.05$)، (جدول ۲)، (تصویر ۱).

در این مطالعه مشخص شد که درصد اووسیت‌های مناسب، لقاح، رویان‌های دو سلولی و درصد بلاستوسیست‌ها در گروه کنترل شم و گروه تجربی، در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش نشان داد ($p < 0.05$). تجویز کروسین سبب شد که درصد اووسیت‌های مناسب، لقاح، دو سلولی و درصد بلاستوسیست‌ها در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل شم، افزایش معنی‌داری را نشان دهد ($p < 0.05$)، (جدول ۱). درصد کل جنین‌های متوقف شده در مراحل مختلف رشد که به مرحله بلاستوسیست نرسیده بودند، در گروه کنترل شم و گروه تجربی، در مقایسه

جدول ۱: مقایسه کیفیت اووسیت و لقاح داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنینی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

متغیر گروه	کل اووسیت تعداد	اووسیت مناسب تعداد (درصد)	لقاح تعداد (درصد)	دو سلولی تعداد (درصد)	بلاستوسیست تعداد (درصد)
کنترل	۲۱۳	(۹۸/۱۲)۲۰۹	(۹۵/۲۱)۱۹۹	(۹۱/۴۵)۱۸۲	(۶۵/۸۲)۱۲۱
کنترل شم	۱۵۲	(۸۶/۱۸)۱۳۱ ^a	(۷۸/۶۲)۱۰۳ ^a	(۷۹/۶۱)۸۲ ^a	(۲۴/۲۷)۲۵ ^a
تجربی	۱۵۱	(۹۴/۰۳)۱۴۲ ^{ab}	(۸۸/۷۳)۲۶ ^{ab}	(۸۷/۷۷)۹۸ ^{ab}	(۴۲/۸۵)۵۴ ^{ab}

^a اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0.05$)

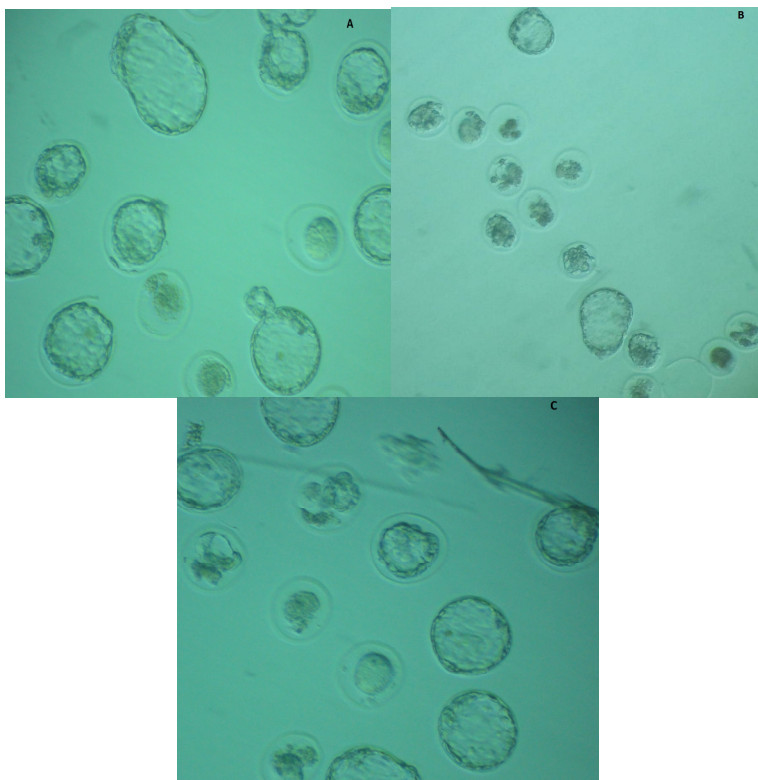
^b اختلاف معنی‌دار با گروه شم ($p < 0.05$)

جدول ۲: مقایسه گروه‌های مختلف از نظر درصد و نوع توقف جنینی

متغیر گروه	جنین متوقف شده تعداد (درصد)	تیپ I تعداد (درصد)	تیپ II تعداد (درصد)	تیپ III تعداد (درصد)
کنترل	(۳۴/۱۷)۶۸	(۱)۲	(۳/۵۱)۷	(۲۹/۶۴)۵۹
کنترل شم	(۷۵/۷۲)۷۸ ^a	(۴۳/۶۸)۴۵ ^a	(۲۰/۳۸)۲۱ ^a	(۱۱/۶۵)۱۲ ^a
تجربی	(۵۷/۱۴)۷۲ ^{ab}	(۳/۱۷)۴ ^b	(۵/۵۵)۷ ^b	(۴۸/۴۱)۶۱ ^{ab}

^a اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($p < 0.05$)

^b اختلاف معنی‌دار با گروه شم ($p < 0.05$)



تصویر ۱: A، گروه کنترل، تمایز درصدی از جنین‌ها به بلاستوسیست با کیفیت مناسب بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون و درصدی از جنین‌ها که در مراحل مختلف رشد متوقف شده‌اند. B، گروه کنترل شم، درصد کمی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده و بلاستوسیست‌های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی ندارند. C، گروه درمان شده با سیکلوفسفامید به همراه کروسین (تجربی) که در مقایسه با گروه کنترل شم، درصد بالایی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده و بلاستوسیست‌های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی دارند و درصد کمی از جنین‌ها متوقف شده‌اند. (میکروسکوپ اینورت، بزرگنمایی $\times 400$)

بحث

القاء استرس اکسیداتیو آن مربوط می‌شود (۲۷). با توجه به اثر سیکلوفسفامید بر کروماتین سلول‌های جنسی و شکست DNA در هسته سلول اووسیت، بخشی از اثرات آن در نسل بعدی F2 ظاهر می‌گردد (۵). در مطالعه‌ای مشخص شده است که تخمک‌هایی که تحت تأثیر سیکلوفسفامید قرار گرفته بودند، پس از استخراج در محیط کشت، تقسیم میوز در آنها ۴۸ ساعت بعد مهار شد، در حالی که برخلاف حیوانات ممکن است در انسان بارداری ادامه پیدا

استرس اکسیداتیو به معنای افزایش در سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن بدن است که از میزان دفاع آنتی‌اکسیدانتی بدن تجاوز می‌کند و سیکلوفسفامید به عنوان یک عامل ایجاد کننده استرس اکسیداتیو در برخی از مشکلات مختلف تولید مثلی نظیر؛ آندومتریوز، اختلال در فولیکولوژنز و ایجاد بلوغ غیر طبیعی تخمک، هیدروسالپینگیسی^(۱)، نکروزواسپرما^(۲) و آستنواسپرما^(۳) دخالت دارد (۲۶ و ۲۵، ۸). همچنین مشخص شده که سیکلوفسفامید دارای خصوصیات سرکوب کننده ایمنی است که بخشی از این ویژگی به

1-Hydrosalpingeal fluid
2- Necrozoospermia
3- Astenospermia

کرده و در نتیجه تحت تأثیر عوامل شیمی درمانی، تکامل جنین‌ها مختل شده و آنومالی در آنها ایجاد شود (۱). این مطالعه برای تعدیل اثرات ثانویه ناشی از استرس اکسیداتیو اعمال شده به وسیله سیکلوفسفامید بر روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی با استفاده از کروسین به عنوان یکی از مواد مؤثر در عصاره زعفران انجام گرفت. در این بررسی میزان رشد و کیفیت جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در گروه کنترل شم، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد و این مشاهدات بیانگر اثر سمی سیکلوفسفامید بر فعالیت تولید مثلی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می‌باشد که با تجویز هم‌زمان کروسین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت، این اثر سمی دارو تخفیف پیدا نموده و سبب افزایش کیفیت و رشد جنین‌ها در محیط آزمایشگاه گردید. تزریق سیکلوفسفامید با دوز بالا به موش‌های سوری ماده، اساساً بر فولیکول‌های مقدماتی تأثیر نموده و سایر شاخصه‌های تخمدانی از قبیل تخمک‌گذاری، انتقال تخمک و تنظیمات نوروآندوکرینی مختل می‌گردد (۲۸). در مطالعه ای که اثر اسانس مرزۀ خوزستانی بر وضعیت لقاح داخل آزمایشگاهی موش‌های سوری ماده بالغ درمان شده با بوسولفان انجام شده مشخص شده است که تجویز عصاره مرزه به همراه شیمی درمانی با بوسولفان، باعث بهبود روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی می‌شود (۲۹). در بررسی دیگری نیز تجویز عصارۀ مرزه خوزستانی به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی و مؤثر به همراه شیمی درمانی با سیکلوفسفامید، باعث

تخفیف سمیت تولید مثلی ایجاد شده به وسیله سیکلوفسفامید در موش‌های سوری نر شد (۳۰). تحقیقات دیگری که در زمینه تعدیل یا جلوگیری از اثرات جانبی داروهای شیمی درمانی به وسیله عواملی که نقش آنتی‌اکسیدانتی دارند انجام شده، نشان دهنده اثرات سمی سیکلوفسفامید روی مورفولوژی اسپرم و بافت تخمدان بود که به وسیله لیکوپن و اسید الازیک به عنوان آنتی‌اکسیدانت، محافظت گردید (۳۱). همچنین نقش محافظتی اسیدآسکوربیک به عنوان آنتی‌اکسیدانت بر اثرات توکسیک سیکلوفسفامید روی اختلالات آندروژنیک و گامتوژنیک تخمدان در رت‌ها به وسیله داس و مالیک (۲۰۰۲) مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که سیکلوفسفامید از فعالیت آنزیم *D5, 3b-hydroxysteroid dehydrogenase (D5, 3b-HSD)* و نیز *17b-HSD* در تخمدان جلوگیری می‌نماید. همچنین به طور معنی‌دار از فعالیت پراکسیداز و کاتالاز جلوگیری نموده و سطح مالون دی‌آلدئید را بالا می‌برد. تمامی این تغییرات با درمان به وسیله اسید آسکوربیک به طور هم‌زمان با سیکلوفسفامید بر عکس شدند (۳۲). نقش محافظتی ویتامین E نیز در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید در موش‌های سوری به اثبات رسیده است. این عمل ویتامین E ممکن است در نتیجه تخریب رادیکال‌های آزاد و نیز تحریک آزادسازی گونادوتروپین‌های لوب قدامی هیپوفیز باشد (۳۳). افزودن آنتی‌اکسیدانت‌هایی نظیر ویتامین E، C و هایپوتائورین به محیط کشت، نسبت تکوین بلاستوسیست در جنین‌های موش را بهبود می‌بخشد (۳۴ و ۱۱) و حضور آنتی‌اکسیدانت‌ها

در محیط کشت موجب بهبود نسبت باروری و افزایش لانه‌گزینی می‌شود (۱۲).

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن تمامی نتایج به دست آمده به همراه تفسیر آنها، مطالعه حاضر این ایده را تقویت می‌کند که سمیت تولید مثلی ناشی از تجویز سیکلوفسفامید به واسطه استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد و یک آنتی‌اکسیدانت قوی مانند کروسین می‌تواند سیستم تولید مثلی را از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله سیکلوفسفامید که اغلب موجب ناباروری می‌شود، محافظت نماید، به طوری که در مطالعه حاضر کروسین توانست در افزایش کیفیت سلول‌های جنسی، میزان لقاح، بهبود روند رشد جنین‌ها در محیط آزمایشگاه و کاهش توقف در مراحل مختلف رشد جنینی، مؤثر باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد بافت‌شناسی مصوب دانشگاه ارومیه می‌باشد که با حمایت مالی گروه بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی این دانشگاه انجام شد.

1. Pryor JL, Hughes F, Hales BF, Robaire B. Critical windows of exposure for children's health. *Environmental Health. Perspective Supple* 2000; 3: 491-503.
2. Ben-Yehuda D, Krichevsky S, Caspi O, Rund D, Polliack A, Abeliovich D, et al. Microsatellite instability and p53 mutations in therapy-related leukemia suggest mutator phenotype. *Blood* 1996; 88(11): 4296-303.
3. Apperley JF, Reddy N. Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemotherapy. *Blood Rev* 1995; 9: 93-116.
4. Chen WY, Yang JG, Huang SH, Li PhS. Effects of cyclophosphamide on maturation and subsequent fertilizing capacity of pig oocytes in vitro. *Chinese Journal of Physiology* 1998; 41: 75-84.
5. Hales BF, Crosman K, Robaire B. Increased postimplantation loss and malformations among the F2 progeny of male rats chronically treated with cyclophosphamide. *Teratology* 1992; 45(6): 671-8.
6. Johannisson R, Ocker H. Cyclophosphamide-induced aberrations of chromosome pairing in pachytene oocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Mutat Res* 1997; 374(2): 185-92.
7. Abdoon AS, Kandil OM, Otoi T, Suzuki T. Influence of oocyte quality culture media and gonadotropins on cleavage rate and development of in vitro fertilized buffalo embryos. *Animal Reproduction Science* 2001; 65(3): 215-23.
8. Guerin P, El Moutassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update* 2001; 7(2): 175-89.
9. Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* 1999; 37(9): 949-62.
10. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, et al. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *International Journal of Fertility and Women's Medicine* 1999; 45(5): 314-20.
11. Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and Sterility* 2002; 78(6): 1272-7.
12. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Human Reproduction* 2000; 15(2): 199-206.
13. Rios J, Recio M, Giner R, Manes S. An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research* 1996; 10(3): 189-93.
14. Abe k, Saito H. Effect of saffron extract and its constituent on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytotherapy Research* 2000; 14(3): 149-52.
15. Escibano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett* 1996; 100: 23.
16. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med* 2005; 227: 20-5.
17. Hosseinzadeh H, Younesi H. Petal and stigma extracts of *Crocus sativus* L. have antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice. *BMC Pharmacol* 2000; 22: 7.
18. Hosseinzadeh H, Khosravan V. Anticonvulsant effects aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigmas in mice. *Arch Iran Med* 2002; 5: 44-7.
19. Karimi G, Hosseinzadeh H, Khaleghpanah P. Study of antidepressant effect of aqueous and ethanolic extract of *Crocus sativus* in mice. *Iran J Basic Med Sci* 2001; 4: 11-5.
20. Hosseinzadeh H, Karimi G, Niapour M. Study of antidepressant effect of aqueous and ethanolic extract of *Crocus sativus* in mice. *Acta Horti* 2004; 650: 435.
21. Akhondzadeh S, Fallah-Pour H, Afkham K, Jamshidi AH, Khalighi-Cigaroudi F. Comparison of *Crocus sativus* L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression. *BMC Complement Med* 2004; 4: 12.
22. Duke JA, Ayensu ES. *Medicinal plants of China*. 1st ed. Michigan: Algonac; 1985; 363.
23. Zargari A. *Medicinal plants*. 2nd ed. Tehran: Tehran University Press; 1990; 574.
24. Hedrich H. *The laboratory mouse: handbook of experimental animals*. 2nd ed. New York: Academic Press; 2006; 439-446.
25. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79: 829-43.

26. Goto Y, Noda Y, Mori T. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 69-75.
27. Merwid-Lad A, Trocha M. Effects of morin-5'-sulfonic acid sodium salt (NaMSA) on cyclophosphamide-induced changes in oxido-redox state in rat liver and kidney. *Hum Exp Toxicol* 2012; 31: 812-8.
28. Perreault SD, Goldman JM. Ovulation, oocyte maturation and oocyte function. *Comprehensive Toxicology* 1997; 10: 305-16.
29. Bamohabat S. Study on prohibition and restoration effect of *saturejakhuzestanica*'s extract against ovarian and fertility defects induced by experienced chemotherapy by busulfan in mice (dissertation). St. Sero: UrmiaUniv; 2012.
30. Rezvanfar MA. Protective effect of *saturejakhuzestanica* essential oil on oxidative stress induced spermatogenic disorders and fertility potential of cyclophosphamide-treated male wistar rat (dissertation). St. Sero: UrmiaUniv; 2009.
31. Turk G, Ceribasi AO. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 587-96.
32. Das UB, Mallick M. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide- induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian J Androl* 2002; 4(3): 201-7.
33. LiD J, Xu ZS, Zhang ZH, Huang QY. Antagonistic effects of vitamin E on the testicular injury by cyclophosphamide in mice. *Zhonghua Nan KeXue* 2006; 12(4): 318-22.
34. Ahmadi A, Sadrkhanloo R. Antioxidative effect of Hypotaurin on suppression of oxidative tension-induced damage on the development of mouse embryo fertilized in vitro. *The Journal of Urmia University of Medical Science* 2010; 21(4): 306.

Evaluation of Protective Effects of Crocin Onembyo Developing Process in in Vitro Fertilization (IVF) in Cyclophosphamide Treated Mice

Khan Mohammadi F^{*}, Shahrooz R, Ahmadi A, Razi M

Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 25 Aug 2013

Accepted: 16 Nov 2013

Abstract

Background & aim: Apart from being an immunosuppressant agent, Cyclophosphamide (CYP) has been known to induce oxidative stress, impact on gonadal cells' DNA and reduce the fertilizing potential. Therefore, the present study was aimed to evaluate the protective effects of crocin, as a potential antioxidant on in vitro fertilized embryo developments when exposed to CYP.

Methods: Thirty six mature female mice, aged 6-8 weeks, were divided into 3 groups and treated for 21 days. The control group received normal saline (0.1 ml/kg,ip/day), and sham control group received CYP alone (15 mg/kg,ip/week) and experimental group received crocin (200mg/kg,ip/day) along with CYP (15 mg/kg,ip/week). Ovarian hyperstimulation PMSG and HCG were administered for stimulating the ovulation process. The sperms were obtained from 6 mature male mice. Animals were anesthetized to easy draw, after oocyte extraction and normal sperm and fertilization, fertilized oocytes were incubated for 120 hours in presence of HTF + 4 mg BSA, and embryonic development was examined. Data were analyzed

Results: A significant reduction were observed in a number of proper oocytes, fertilization rate, two-cell embryos and blastocysts In the sham control group, but a significant increase in the number of stopped embryos in the control group were seen. Crocin administration significantly increased the number of proper oocytes, fertilization rate, two-cell embryos, blastocysts and embryos stopped significantly decreased compared to the sham control group ($p < 0.05$).

Conclusion: The crocin therapy co-administration with CYP resulted in a significant improvement of fertilizing potential and promoted the embryo development in vitro.

Key words: Cyclophosphamide, Crocin, Mice, Oocyte, In vitro fertilizing

***Corresponding author:** Khan Mohammadi F, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
Email: Fahimekh685@yahoo.com